

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/087917 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C07K
14/47, C12N 15/11, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/00,
A61K 38/17, A61P 35/00TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区
霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004523

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 30 日 (30.03.2004)

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 石井 保之 (ISHII,

(25) 国際出願の言語: 日本語

Yasuyuki) [JP/JP]; 〒5638577 大阪府池田市緑丘 1 丁目

(26) 国際公開の言語: 日本語

8 番 3 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所関西セ

(30) 優先権データ:

特願2003-093342 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP

特願2003-349109 2003 年 10 月 8 日 (08.10.2003) JP

ンター内 Osaka (JP). 淀井 淳司 (YODOI, Junji) [JP/JP];

〒5638577 大阪府池田市緑丘 1 丁目 8 番 3 1 号 独立

行政法人産業技術総合研究所関西センター内 Os-

aka (JP). 中村 肇 (NAKAMURA, Hajime) [JP/JP]; 〒

5731118 大阪府枚方市楠葉並木 2-6-3 Osaka (JP).

近藤 則彦 (KONDO, Norihiko) [JP/JP]; 〒5638577 大阪

府池田市緑丘 1 丁目 8 番 3 1 号 独立行政法人産業

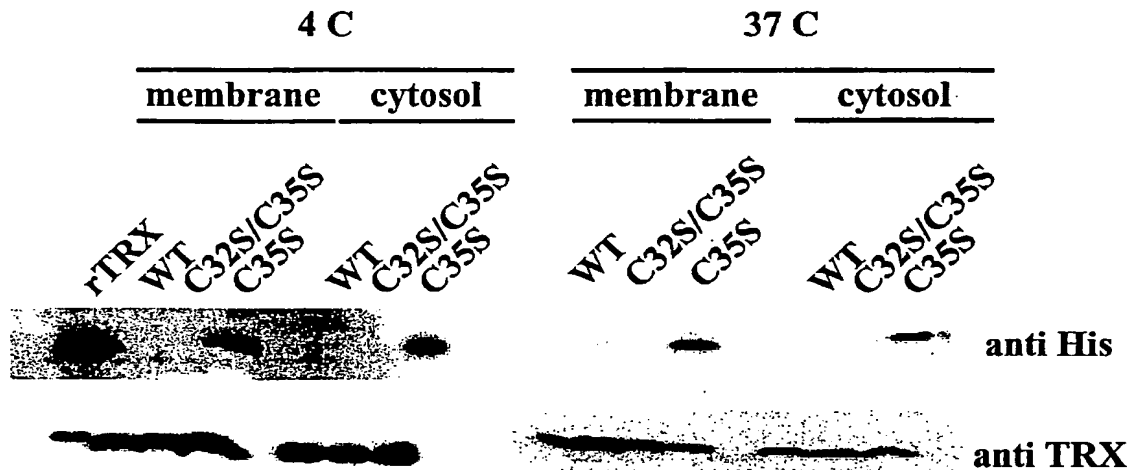
技術総合研究所関西センター内 Osaka (JP).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND

[続葉有]

(54) Title: THIOREDOXIN MODIFICATION

(54) 発明の名称: チオレドキシン改変体



(57) Abstract: A human thiorodoxin modification which comprises one of the following polypeptides: (a) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 by alteration or chemical modification of the cysteine residue at the 35-position; and (b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 by substitution of the cysteine residue at the 35-position by another amino acid residue, and substitution, deletion, insertion or addition of one or more amino acids at the 32- and 35-positions (preferably at site(s) excluding from the 32- to the 35-positions) in the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and having an activity of inducing apoptosis.

(57) 要約: 本発明は、以下のいずれかのポリペプチドからなるヒトチオレドキシン改変体: (a)配列番号2のアミノ酸配列の35位のシステイン残基が改変又は化学修飾により改変体化されたポリペプチド; (b)配列番号2のアミノ酸配列の35位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換され、さらに配列番号2のアミノ酸配列の32位と35位、好ましくは32位~35位を除く部位において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチドに関する。



(74) 代理人: 三枝 英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

チオレドキシン改変体

技術分野

本発明は、生体内において内因的および/または外因的要因によって引き起こされる細胞増殖異常および/または細胞機能を制御することができるチオレドキシン(以下、「TRX」という)改変体タンパク質および必須最小化ペプチド、該改変体タンパク質および必須最小化ペプチドをコードするDNA、該DNAを含む組換え発現ベクター、該DNAで形質転換された細胞、該TRX改変体タンパク質および必須最小化ペプチドの製造方法、並びに該TRX改変体タンパク質および/または必須最小化ペプチドを含む医薬品または医薬組成物に関する。

背景技術

チオレドキシンはその活性部位配列の-Cys-Gly-Pro-Cys-内にレドックス活性なジスルフィド/ジチオールを有する小さい 12 kDa の多機能タンパク質である(“Redox regulation of cellular activation” *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15:351-369.)。チオレドキシンはリボヌクレオチドリダクターゼに対するハイドロゲン供与体、デオキシリボヌクレオチドの合成に重要な酵素として大腸菌から単離されて以来、多くの原核生物、真核生物から単離同定されてきた。成人T細胞白血病誘導因子(ADF)は、本発明者らが HTLV-I に感染したTリンパ球によって産生される IL-2 受容体誘導因子として最初に同定したもので、ヒトチオレドキシンである。細胞内チオレドキシンはラジカル消去や、activator protein-1 や nuclear factor- κ B などのレドックスに関する転写因子の制御に重要な役割を果たしている(“AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1” 1997; 94: 3633-3638.)。さらに、ヒトチオレドキシンは p38 mitogen activating protein kinase (MAPK) や apoptosis signal regulating kinase-1 (ASK-1) のシグナル伝達を制御する。

一方、我々はチオレドキシンが細胞外に放出され、サイトカインまたはケモカイン作用を示すことを報告してきたが、その作用機序は不明であった。また細胞外TRXが細胞内へ移行することや、TRX活性部位を改変することにより野生型TRXをはるかに凌ぐ細胞内移行活性を示すことは報告されていない。

本発明は、TRXの細胞内制御活性および細胞内移行活性を解析し、該活性に基づくTRX改変体ならびにその製造方法を提供することを目的とする。

図面の簡単な説明

図1は、実施例2のフローサイトメトリー解析結果を示す。

5 図2は、実施例2のフローサイトメトリー解析結果を示す。

図3は、実施例2のウェスタンブロット解析結果を示す。

図4は、実施例3のアポトーシス解析結果を示す。

図5は、 ^3H -チミジンの取り込み量をシンチレーションカウンターで測定した結果を示す。

図6は、実施例4の抗癌剤作用の増強効果-1の結果を示す。図6において、CDDP(-)

10 はシスプラチンの不存在を示し、CDDP(+)はシスプラチン $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在を示し、TRX-WTは野生型チオレドキシン、TRX-CSはC32S及びC35Sの2箇所を改変した改変体チオレドキシン、TRX-C35SはC35S改変体チオレドキシンを示す。CDDP(-)において、死細胞数は4%(TRX-WT)、3%(TRX-CS)と比較してTRX-C35Sは4倍程度増加する。また、CDDP(+)($3\mu\text{g}/\text{ml}$)において、死細胞数は5%(TRX-WT)、13%(TRX-CS)と比較して

15 TRX-C35S(26%)は5倍ないし2倍増加する。

図7は、実施例4の抗癌剤作用の増強効果-2の結果を示す。図7において、CDDPはシスプラチンを示し、rec(-)は組換え体チオレドキシン(C35S-TRX)の不存在を示し、rec(+)

20 CDDP($3\mu\text{g}/\text{ml}$)、においてC35S-TRXを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在させると、共陽性細胞数は10%→22%に2倍増加し、CDDP($6\mu\text{g}/\text{ml}$)では、C35S-TRXを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在させると、共陽性細胞数は18%→76%に4倍増加する。

また、C35S-TRXで1時間処理した場合には、CDDP($3\mu\text{g}/\text{ml}$)、においてC35S-TRXを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在させると、共陽性細胞数は7%→33%に4.7倍増加し、CDDP

25 ($6\mu\text{g}/\text{ml}$)では、チオレドキシン改変体を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在させると、共陽性細胞数は23%→70%に3倍増加する。

本発明者らは、TRXの細胞内制御活性および細胞内移行活性を詳細に解析した結果、細胞外ヒト組換えTRX野生型の細胞内移行活性を同定することに成功した。さらに該活性に基づき、TRX改変体を作製することに成功した。すなわち本発明の主題は以下のとおりである。

- 5 1. 以下のいずれかのポリペプチドからなるヒトチオレドキシン改変体:
 - (a)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されたポリペプチド;
 - (b)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が化学修飾されたポリペプチド;
 - (c)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換され、
- 10 さらに配列番号2のアミノ酸配列の32位と35位を除く部位、好ましくは32位～35位を除く部位において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチド。
 - (d)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されたヒトチオレドキシン改変体をコードする DNA 又はその相補鎖とストリンジェントな条件下で
- 15 ハイブリダイズし得る DNA によりコードされるポリペプチド。
 2. 上記他のアミノ酸残基がセリンである、項1記載のヒトチオレドキシン改変体。
 3. 以下のいずれかの DNA からなるアポトーシス誘導活性を有するヒトチオレドキシン改変体をコードする遺伝子:
 - (1)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換され、
- 20 さらに配列番号2のアミノ酸配列の32位と35位を除く部位、好ましくは32位～35位を除く部位において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。
 - (2)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されたヒトチオレドキシン改変体をコードする DNA 又はその相補鎖とストリンジェントな条件下で
- 25 ハイブリダイズし得、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチドをコードするDNA
 4. 項3に記載の遺伝子を発現可能に組み込んでなる組換え発現ベクター。
 5. 項4に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換体。
 6. 項5に記載の形質転換体を培養することを特徴とするアポトーシス誘導活性を有するポリペプチドの製造方法。

7. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A-、-Cys-Pro-His-A-または-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含む生理活性物質の細胞内導入用ポリペプチド。
8. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A-、-Cys-Pro-His-A-または-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの生理活性物質を細胞内に導入するための使用。
9. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A-、-Cys-Pro-His-A-または-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに生理活性物質を結合させることを特徴とする細胞内に導入可能な生理活性物質複合体
10. の製造方法。
10. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A-、-Cys-Pro-His-A-または-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに生理活性物質を結合してなる細胞内に導入可能な生理活性物質複合体。
11. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A-、-Cys-Pro-His-A-または-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列の35位のシステイン残基が他のアミノ酸で置換されたポリペプチドである項10に記載の複合体。
12. 上記生理活性物質がタンパク質またはポリペプチドである項10又は11に記載の複合体。
13. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A-、-Cys-Pro-His-A-または-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと生理活性ポリペプチドを結合した複合体をコードするポリヌクレオチドを有する組換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養することを特徴とする細胞内に導入可能なポリペプチド複合体の製造方法。
14. 項1又は2に記載のチオレドキシン改変体からなる抗癌剤。
15. 項1又は2に記載のチオレドキシン改変体からなる抗癌増強剤。
16. 項1又は2に記載のチオレドキシン改変体と他の抗ガン剤を含む抗癌剤組成物。
17. 項1又は2に記載のチオレドキシン改変体を必要に応じて他の抗癌剤と組み合わせて癌患者に投与することを包含する癌の治療方法。

18. 請求項10～12のいずれかに記載の複合体と必要に応じて薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む医薬又は医薬組成物。

以下、本発明をより詳細に説明する。

- 5 本明細書において、ヒトチオレドキシン(hTRX)とは、配列番号2に示される105個のアミノ酸からなるポリペプチドを意味する。

本発明のhTRXは、ヒトチオレドキシン以外に「チオレドキシンスーパーファミリー」に属するものであってもよく、その活性中心に-Cys-Gly-Pro-Cys-、-Cys-Pro-Tyr-Cys-、-Cys-Pro-His-Cys-、-Cys-Pro-Pro-Cys-を有するポリペプチド類を有するものが例示される。これらの中でも、活性中心に配列-Cys-Gly-Pro-Cys-を有するポリペプチド類が好ましい。

本発明の第1の実施形態においては、TRXの35位のシステインを他のアミノ酸に変換してTRX改変体とすることにより、細胞死(アポトーシス)誘導活性及び細胞増殖抑制活性を発現し、抗ガン剤として有用であることが見出された。

- 15 また、本発明の第2の実施形態は、TRXの35位のシステイン残基を他のアミノ酸に変換して改変体とするか、該システイン残基(特にチオール残基)を化学修飾するか、のいずれかの方法によりTRX改変体とすることにより、細胞内へのTRX改変体の取り込みが劇的に上昇するとの知見に基づくものであり、その細胞内取り込み促進作用の本体が
- Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A、-Cys-Pro-His-Aまたは-Cys-Pro-Pro-A (A
- 20 はCys以外の任意のアミノ酸又はシステインの化学修飾体を示す)で表されるアミノ酸配列にあることは本発明者により初めて明らかにされた。

上記のTRX活性中心のC末端側の35位Cysは、任意の19種のアミノ酸(Gly, Ala, Met, Ser, The, Lys, Arg, His, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Pro, Gly, Asp, Gln, Asn)のいずれで置換されてもよく、好ましくはSerで置換される。

- 25 35位システインの化学修飾体としては、システインのチオール(SH)基が、SRで表される基(Rは任意の有機基、例えば炭素数1～18の直鎖又は分枝を有するアルキル基、炭素数2～18の直鎖又は分枝を有するアルケニル基、炭素数2～18の直鎖又は分枝を有するアルキニル基、炭素数2～18の直鎖又は分枝を有するアルコキシアルキル基、炭素数1～18の直鎖又は分枝を有するヒドロキシアルキル基、炭素数1～18のアシル基、

- 炭素数6～18のアリール基、炭素数7～18のアラルキル基などが挙げられ、これらの基は、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、メキシ基、カルボキシル基、エステル基などの置換基で置換されていてもよい。)に化学修飾されたものが挙げられる。このような化学修飾体は公知の方法により、容易に合成可能である。

本発明の好ましいチオレドキシン改変体及び該改変体をコードする遺伝子は、配列番号11に示される。

本発明のチオレドキシン改変体は、細胞死(アポトーシス)誘導活性及び細胞増殖抑制活性を発現し、抗ガン剤として有用であることが見出された。

- 10 さらに、本発明のチオレドキシン改変体は、抗ガン剤と併用することにより、抗ガン作用を増強することができる。特に、抗ガン有効量未満の濃度の抗ガン剤と併用することにより、抗ガン作用を発現することができ、抗ガン剤の作用を増強し、副作用を軽減できる。

- 併用により効果を増強される抗ガン剤としては、アドリアマイシン、メトレキセート、タキソール、5-フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、マイトマイシン、シスプラチン、ダウノマイシン、エトポシド、タキソテールなどが挙げられる。

本発明のチオレドキシン改変体と抗ガン剤は、同時に投与しても良く、別々に投与してもよい。

本発明の好ましい実施形態の1つは、チオレドキシン改変体と抗ガン剤を投与する癌の治療方法に関する。

- 20 治療され得るガンとしては特に限定されず、胃癌、結腸癌、直腸癌、肝癌、胆のう・胆管癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮頸癌等が挙げられる。

本発明のチオレドキシン改変体からなる抗癌剤の治療的有效量は、成人癌患者1日当たり0.01～100mg程度であり、抗癌増強剤として使用する場合は治療的有效量は0.001～10mg程度である。

- 25 本発明の1つの好まし実施形態において、本発明のチオレドキシン改変体は、配列番号2のヒトチオレドキシンをもとにして公知の遺伝子工学的的手法により改変体を製造することができる。該改変体は、配列番号2の32位と35位以外、好ましくは32位～35位以外のアミノ酸の1又は複数個、好ましくは1又は数個が置換、欠失、付加、挿入され、且つ、アポトーシス誘導活性を有するものである。このような変異(置換、欠失、付加、挿入)の導

入は、自然界において生じる(例えば対立遺伝子)他に、人為的な変異も含む。人為的な変異を生じさせる手段としては、部位特異的な変異誘導法(Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982)などを挙げることはできるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、アポトーシス誘導活性が失われない限り、その個数は制限されないが、好ましくは 20 アミノ酸以内であり、より好ましくは 15 アミノ酸以内であり、更に好ましくは 10 アミノ酸以内であり、最も好ましくは 5 アミノ酸以内である。

本発明の他の好ましい実施形態において、配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されたヒトチオレドキシン改変体をコードする DNA 又はその相補鎖とストリンジントな条件下でハイブリダイズし得、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチドをコードする DNA (例えば配列番号11に記載の DNA) が挙げられ、該 DNA がコードするタンパクは、アポトーシス誘導活性を有する。

本明細書において「ストリンジントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1xSSC, 0.1%SDS, 37℃」程度であり、好ましくは「0.5xSSC, 0.1%SDS, 42℃」程度であり、更に好ましくは「0.2xSSC, 0.1%SDS, 65℃」程度である。本発明の DNA は35位が変異された本発明のポリペプチドをコードする DNA (例えば配列番号11に記載の DNA) と通常高い相同性を有する。高い相同性とは、75%以上の相同性、好ましくは 90%以上の相同性、更に好ましくは 95%以上の相同性、特に99%以上の相同性を指す。

本発明のタンパクは、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。ベクターとしては、適宜公知のものを選定して用いることができ、例えば、pTrc-HisA などを用いることができる。宿主細胞としては哺乳動物細胞、酵母などの真核生物細胞、大腸菌、枯草菌、藻類、真菌類などの原核生物細胞が挙げられ、そのいずれを用いてもよい。

理論により限定されることを意図するものではないが、35位の Cys を Ser などの他のアミノ酸で置換すると、TRXのアンタゴニストとして機能するようになるため、TRX改変体はアポトーシスの誘導活性ないし細胞増殖抑制活性を発現するものと考えられる。

さらに、35位をSerなどの他のアミノ酸で置換したTRX改変体は、32位のCysで細胞表面に結合し、35位にCysがないことから35位における細胞表面での結合が行われず、結果としてTRX改変体は細胞内に急速に取り込まれることになると考えている。このメカ

ニズムはTRXのSer³²改変体(35位はCys;配列番号14)、Ser³²Ser³⁵改変体(配列番号13)と野生型(32位と35位がCys;配列番号2)は、いずれも細胞内にほとんど取り込まれないことから支持される。

即ち、-Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A、-Cys-Pro-His-Aまたは-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列、特に-Cys-Gly-Pro-A(Aは前記に同じ)は細胞内に生理活性物質を取り込ませるための先導ペプチドの役割を果たすことが明らかであり、該テトラペプチドを生理活性物質に結合させることにより、細胞内への取り込みが困難であった生理活性物質を細胞内に導入することが可能である。

- 10 本明細書において、「改変体」は変異体と修飾体を両方とも包含する言葉として使用する。

生理活性物質としては、細胞内に取り込まれて機能する医薬化合物、オリゴペプチド、ポリペプチド、単糖、二糖ないし多糖類、脂質、などが挙げられ、好ましくは医薬化合物、オリゴペプチド、ポリペプチド(糖蛋白を含む)が例示される。また、前記テトラペプチドを
15 含む先導ペプチドのN末端及びC末端に適切な配列を結合させることにより標的となる細胞への選択性を高めることも可能である。

生理活性物質としての医薬化合物には、抗ガン剤、抗ウイルス剤などが例示され、生理活性ポリペプチドとしては、酵素、抗体、ホルモンなどが例示される。

本発明の先導ペプチドは、必要に応じてスペーサーペプチドを介して生理活性物質、
20 を結合することができる。例えば、生理活性物質がポリペプチドの場合には、前記先導ペプチドと必要に応じてスペーサーペプチドを介して生理活性ポリペプチドを結合させて複合体とし、該複合体をコードするDNAを適当な組換えベクターに導入し、大腸菌などの細菌、CHOなどの動物細胞、酵母等の宿主を形質転換し、該形質転換体を培養することにより、複合体を製造することが可能である。

- 25 前記スペーサーとして、細胞内で切断可能な短鎖ペプチド配列を導入することにより、細胞内で生理活性物質、特に生理活性オリゴペプチドまたはポリペプチドに導くことも可能である。このような切断可能なペプチドとしては、Caspase-1 によって特異的に切断される human pro-interleukin-1 β (pro-IL-1 β) の切断部位の配列である-A YVHDAP

VK-、及び Caspase-3、-7 などによって切断される human poly-ADP-ribose polymerase (PARP) の切断部位の配列である-GDEVVDGVK-が例示される。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、これらの実施例は説明の

5 ためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕

組換え TRX 野生型および改変体の作製

1. 大腸菌発現系の構築

- TRXポリペプチドに存在する 32 位および/または 35 位のシステイン残基について、配
- 10 列番号1のTRX遺伝子の当該部位のヌクレオチドに変異を入れてセリン残基に置換した。
- TRX 32 位システイン残基のセリン残基への変異体 (TRX-C32S; 配列番号14) 遺伝子の作製には、テンプレートDNAとしてベクターpcDNA3.1 にヒトTRX cDNA (配列番号1) を挿入したプラスミドDNAを用い、プライマーに 5'-GGA TCC GTG AAG CAG ATC GAG AGC AAG -3' (配列番号3)と 5'-CTT GAT CAT TTT GCA AGG CCC AGA
- 15 CCA-3' (配列番号5) および 5'-GTC GAC TTA GAC TAA TTC ATT AAT GGT GGC-3' (配列番号4)と 5'-TGG TCT GGG CCT TGC AAA ATG ATC AAG-3' (配列番号6)をそれぞれ用いた PCR を実行した。次に増幅した2つのDNA断片を等量で混合し、さらに 5'-GGA TCC GTG AAG CAG ATC GAG AGC AAG -3' (配列番号3)と 5'-GTC GAC TTA GAC TAA TTC ATT AAT GGT GGC-3' (配列番号4)プライマーを
- 20 添加した後、PCR で TRX-C32S 全長を増幅した。各PCRサイクルにおける条件は、95℃、1 分間、アニーリングは 56℃、1 分間、伸長は 72℃、2 分間の条件で行った。同様に TRX 35 位システイン残基のセリン残基への変異体 (TRX-C35S; 配列番号12) 遺伝子または TRX 32 位と 35 位両方のシステイン残基のセリン残基への変異体 (TRX-C32S/C35S; 配列番号13) 遺伝子の作製には、TRX-C32S 遺伝子作製時に使用したプ
- 25 ライマー (配列番号5と6) の代わりに、5'-CTT GAT CAT TTT GGA AGG CCC ACA CCA-3' (配列番号7)と 5'-TGG TGT GGG CCT TCC AAA ATG ATC AAG-3' (配列番号8)または 5'-TGG TCT GGG CCT TCC AAA ATG ATC AAG-3' (配列番号9)と 5'-CTT GAT CAT TTT GGA AGG CCC AGA CCA-3' (配列番号10)をそれぞれ用いたPCRを行った。また野生型 TRX (TRX-WT) はテンプレートDNAとしてベクター

pcDNA3.1 にヒトTRX cDNA(配列番号1)を挿入したプラスミドDNAを用い、プライマーに 5'-GGA TCC GTG AAG CAG ATC GAG AGC AAG -3' (配列番号3)と 5'-GTC GAC TTA GAC TAA TTC ATT AAT GGT GGC-3' (配列番号4)を用いて、PCR で TRX-WT 全長を増幅した。PCR で増幅した TRX-WT、TRX-C32S、TRX-C35S または

5 TRX-C32S/C35S のDNA断片を TOPO クローニングベクター(インビトロジェン社製)にライゲートした後、大腸菌宿主細胞に導入した。形質転換クローンよりプラスミドDNAを回収した後、インサート DNA の配列を DNA シークエンス法で確認した。引き続きプラスミドDNAを制限酵素 BamHI と SalI で切断し、得られたフラグメントをヒスチジンタグ付加組換えタンパク質発現ベクターpQE80L(キアゲン社製)にライゲートした後、XL-1 Blue

10 に大腸菌宿主細胞を形質転換した。

2. 組換え TRX 野生型および改変体を生産する大腸菌の培養

TRX 野生型または改変体遺伝子を挿入した pQE80L プラスミドDNAで形質転換した大腸菌株を前培養後、3 リットルの terrific broth (BRL)(100 ug/ml Ampicillin 入り)にシードし、4 時間培養した。その後、最終濃度が 1 mM になるように IPTG を加え、さらに 2-4 時

15 間培養した。

3. 組換え TRX 野生型および改変体の精製

回収した細胞は、lysozyme(2mM)入りの lysis buffer (protease inhibitor, 0.8 mM Imidazol, 2-mercapt ethanol)を加え懸濁した後、超音波破碎機にて細胞を破碎した。15000 rpm 30 分の遠心後、上清を回収し、PBSで平衡化した Ni アガロースカラム(キア

20 ゲン社製)にアプライした(Ni カラムはあらかじめ PBS で置換しておく)。サンプルをアプライ後、20 mM Imidazol 含有 PBS を用いてカラムを洗浄し、80 mM Imidazol 含有 PBS で溶出した。溶出されたサンプルは PD-10 カラムを用いて PBS 溶液に置換した。

[実施例2]

組換え TRX 野生型および改変体の培養細胞内への移行

25 1. 細胞結合能

5×10^5 個の HTLV-I 感染ヒトT細胞株 ATL2 に最終濃度が 1ug/ml になるように蛍光標識した TRX-WT、TRX-C35S または TRX-C32SC35S を添加し、4°Cで30分インキュベート後フローサイトメトリー用バッファー(0.1%アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝液)で洗浄した。続いて、フローサイトメトリー解析を行った(図1)。その結果、TRX-C35S のみが細胞

に結合できることが確認された。この結合は大過剰の TRX-WT を共存させることによって阻害されることも確認された(図2)

2. 細胞内移行

組換え体ヒスチジンタグ化タンパク質 TRX-WT、TRX-C35S または TRX-C32SC35S
5 を最終濃度 10 ug/ml で ATL2 細胞に添加し、4℃または37℃で1時間インキュベートした。つぎに細胞を回収し磷酸緩衝液で洗浄後、 1×10^7 個の細胞を1ml のバッファー(hypotonic buffer)に懸濁し、窒素ガス細胞破碎装置(パール社製)で細胞を破碎した。1000gで遠心後、上清を回収し続いて 10,000gの遠心分離で上清の細胞質画分を回収した。細胞質画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動と抗TRXモノクローナル抗体を
10 用いるウエスタンブロット解析を行った(図3)。その結果、TRX-C35S のみが細胞質画分に検出されることが確認された。

[実施例3]

TRX 野生型および改変体の生物学的活性

1. 細胞死誘導活性

15 TRX-WT、TRX-C35S または TRX-C32S/C35S 遺伝子を導入したヒトT細胞株 Jurkat を無血清RPMI培地で 72 時間培養することにより誘導されるアポトーシスを解析した(図4)。その結果、TRX-C35S を細胞内に高発現した Jurkat 細胞は、TRX-WT または TRX-C35S を導入した Jurkat 細胞よりもアポトーシスが亢進された。

2. 細胞増殖抑制活性

20 5×10^5 個のヒト末梢血単核球を1ml の 10%牛胎児血清含有RPMI培地にけん濁後、PHA を最終濃度 28 ng/ml と 10 ug/ml の TRX-WT, または TRXC32S/C35S, または TRX-C35S をそれぞれ添加し培養した。96 時間後に ^3H -チミジンを添加しその取り込み量をシンチレーションカウンターで測定した(図 5)。その結果、組換え体 TRX-WT タンパク質添加群が無添加群に比べて細胞増殖能が上昇しているのに対して、組換え体
25 TRX-C35S タンパク質添加群は細胞増殖が抑制されていることが確認された。

[実施例4]

1. 抗癌剤作用の増強効果-1

ヒトT細胞株 Jurkat に野生型(WT) TRX、C32S/C35S 誘導体(CS)TRX または C35S 誘導体-TRX 遺伝子を導入し樹立した高発現細胞に、最終濃度 3 $\mu\text{g/ml}$ のシスプラチン

(CDDP; cis-PLATINUM (II)-DIAMMINE DICHLORIDE, Sigma)を添加した。24時間培養後の細胞に Annexin V-FITC, propidium iodide(Medical & Biological Laboratories CO., LTD)を結合させ、フローサイトメーターで細胞死の状態を示す共陽性細胞数を解析した。その結果、C35S-TRX を高発現する細胞株では、WT-TRX や CS-TRX 発現細胞株に比べて Annexin V-FITC と propidium iodide の共陽性の死細胞数が4倍近く増加していることが確認された。

2. 抗癌剤作用の増強効果ー2

ヒトT細胞株 Jurkat の培養液中に、 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で組換え C35S-TRX タンパク質を添加し、1時間または3時間インキュベートした後、最終濃度 $3 \mu\text{g/ml}$ または $6 \mu\text{g/ml}$ のシスプラチンを添加した。24時間培養後の細胞に Annexin V-FITC と propidium iodide を結合させ、フローサイトメーターで細胞死の状態を示す共陽性細胞数を解析した。その結果、組換え C35S-TRX タンパク質を予め添加した群では、添加していない群に比べて Annexin V-FITC と propidium iodide の共陽性細胞数が多く、 $3 \mu\text{g/ml}$ のシスプラチンを添加した群では約2倍、 $6 \mu\text{g/ml}$ のシスプラチンを添加した群では約4倍増加していた。またその効果は C35S-TRX タンパク質の前処理時間が1時間の群よりも3時間の群の方が高かった。

以上、本発明の好ましい態様について記載したが本発明の精神を逸脱することなく種々の変更および改良が可能であることが当業者には明らかであることが理解されよう。従って、本発明の範囲は、以下の請求の範囲によってのみ決定されるべきであろう。

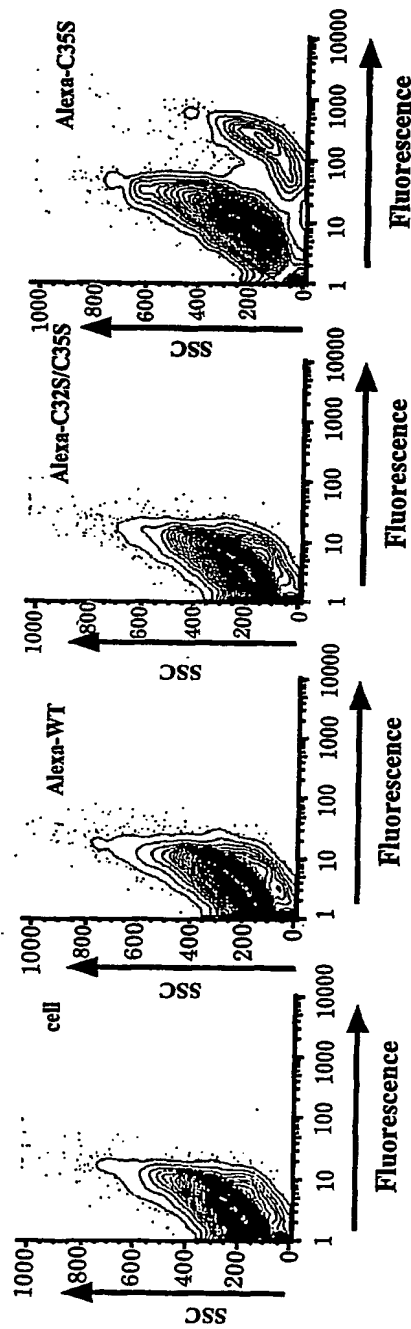
20 本発明により、高い細胞増殖抑制活性を有するTRX改変体タンパク質の安定かつ大量生産及び、迅速な細胞内移行を可能にするTRX改変体由来ペプチド配列を利用したベクター開発が可能になる。TRX改変体タンパク質及びTRX改変体由来ペプチドを融合させた生理活性物質(タンパク質、脂質、核酸、有機化合物、無機化合物)は、多様な疾患領域の治療および/または予防に利用することができる。

請求の範囲

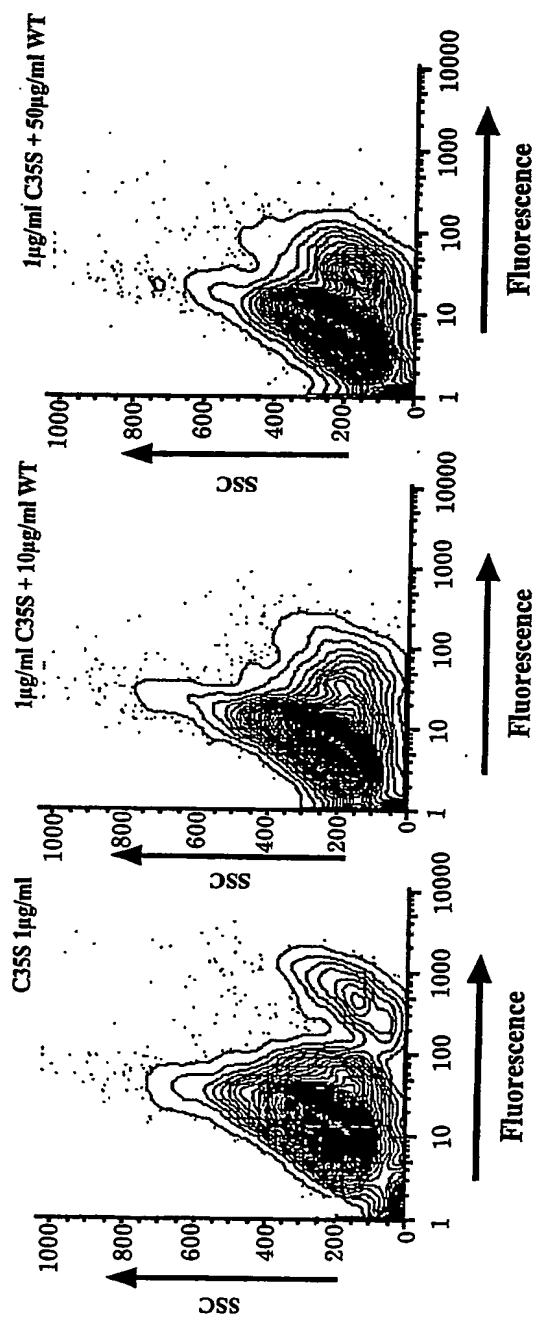
1. 以下のいずれかのポリペプチドからなるヒトチオレドキシン改変体:
 - (a)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されたポリペプチド;
 - 5 (b)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が化学修飾されたポリペプチド;
 - (c)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換され、さらに配列番号2のアミノ酸配列の32位と35位を除く部位、好ましくは32位～35位を除く部位において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチド。
 - 10 (d)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されたヒトチオレドキシン改変体をコードする DNA 又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る DNA によりコードされるポリペプチド。
2. 上記他のアミノ酸残基がセリンである、請求項1記載のヒトチオレドキシン改変体。
3. 以下のいずれかの DNA からなるアポトーシス誘導活性を有するヒトチオレドキシン
- 15 改変体をコードする遺伝子:
 - (1)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換され、さらに配列番号2のアミノ酸配列の32位と35位を除く部位、好ましくは32位～35位を除く部位において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。
 - 20 (2)配列番号2のアミノ酸配列の 35 位のシステイン残基が他のアミノ酸残基で置換されたヒトチオレドキシン改変体をコードする DNA 又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得、かつ、アポトーシス誘導活性を有するポリペプチドをコードするDNA
4. 請求項3に記載の遺伝子を発現可能に組み込んでなる組換え発現ベクター。
5. 請求項4に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換体。
- 25 6. 請求項5に記載の形質転換体を培養することを特徴とするアポトーシス誘導活性を有するポリペプチドの製造方法。
7. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A-、-Cys-Pro-His-A-または-Cys-Pro-Pro-A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含む生理活性物質の細胞内導入用ポリペプチド。

8. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A、-Cys-Pro-His-Aまたは-Cys-Pro-Pro-A-
(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドの生
理活性物質を細胞内に導入するための使用。
9. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A、-Cys-Pro-His-Aまたは-Cys-Pro-Pro-
5 A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに
生理活性物質を結合させることを特徴とする細胞内に導入可能な生理活性物質複合体
の製造方法。
10. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A、-Cys-Pro-His-Aまたは-Cys-Pro-Pro-
A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに
10 生理活性物質を結合してなる細胞内に導入可能な生理活性物質複合体。
11. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A、-Cys-Pro-His-Aまたは-Cys-Pro-Pro-
A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドが、
配列番号2のアミノ酸配列の35位のシステイン残基が他のアミノ酸で置換されたポリペプ
チドである請求項10に記載の複合体。
- 15 12. 上記生理活性物質がタンパク質またはポリペプチドである請求項10又は11に記
載の複合体。
13. -Cys-Gly-Pro-A、-Cys-Pro-Tyr-A、-Cys-Pro-His-Aまたは-Cys-Pro-Pro-
A-(AはCys以外の任意のアミノ酸を示す)で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと
生理活性ポリペプチドを結合した複合体をコードするポリヌクレオチドを有する組換えベ
20 クターにより形質転換された形質転換体を培養することを特徴とする細胞内に導入可能
なポリペプチド複合体の製造方法。
14. 請求項1又は2に記載のチオレドキシン改変体からなる抗癌剤。
15. 請求項1又は2に記載のチオレドキシン改変体からなる抗癌増強剤。
16. 請求項1又は2に記載のチオレドキシン改変体と他の抗ガン剤を含む抗癌剤組
25 成物。
17. 請求項1又は2に記載のチオレドキシン改変体を必要に応じて他の抗癌剤と組
み合わせて癌患者に投与することを包含する癌の治療方法。
18. 請求項10～12のいずれかに記載の複合体と必要に応じて薬学的に許容される
担体、賦形剤または希釈剤を含む医薬又は医薬組成物。

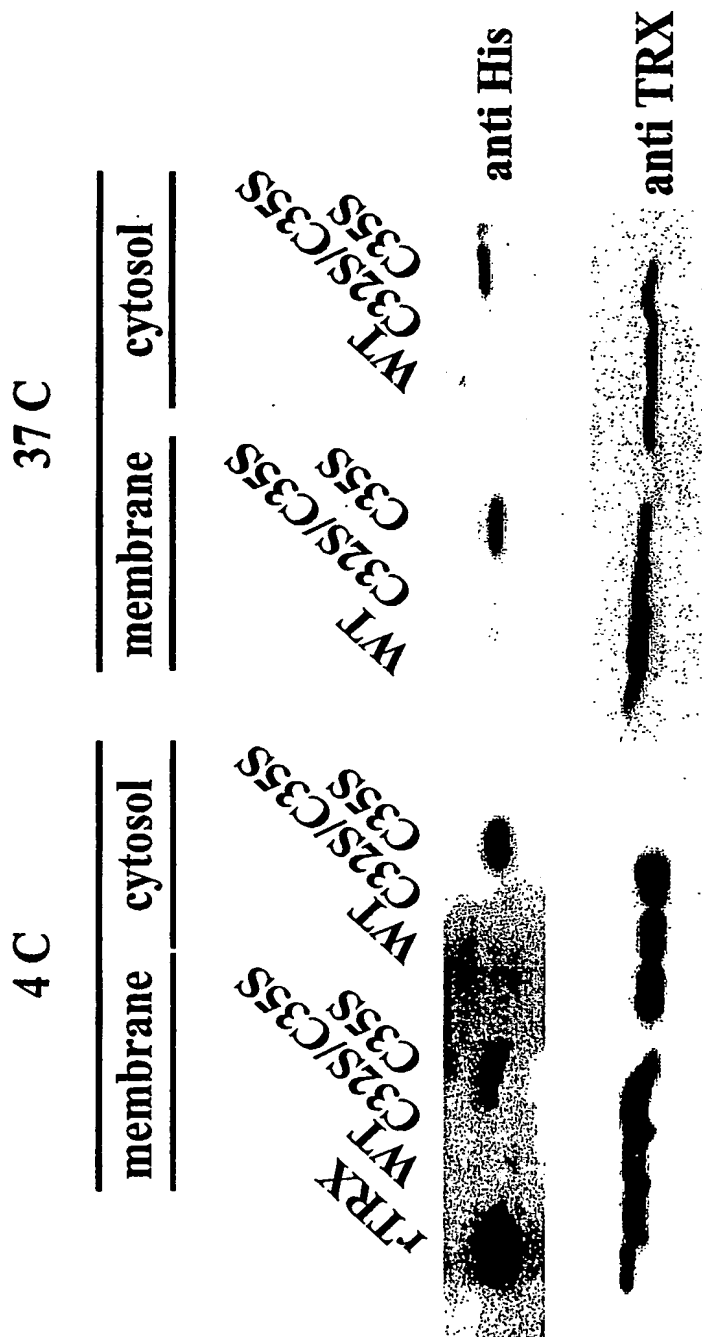
1 / 7
Fig. 1



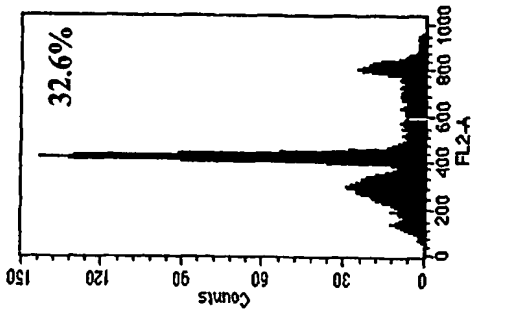
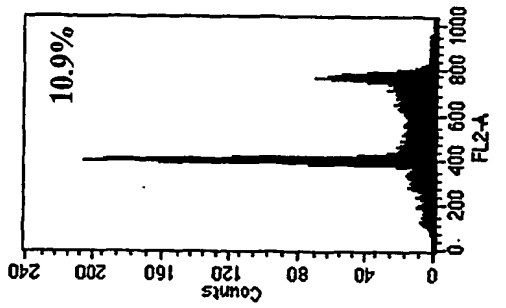
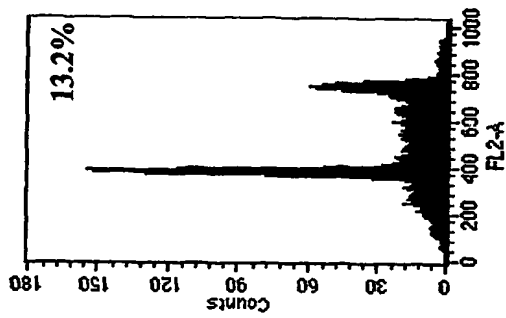
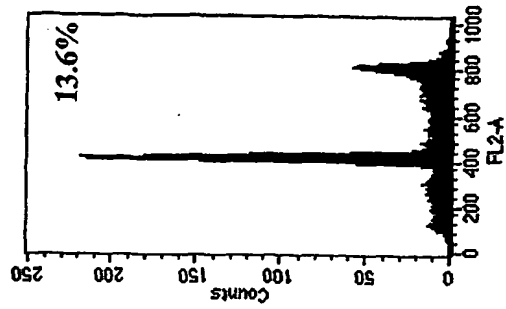
2 / 7
F i g . 2



3 / 7
F i g . 3

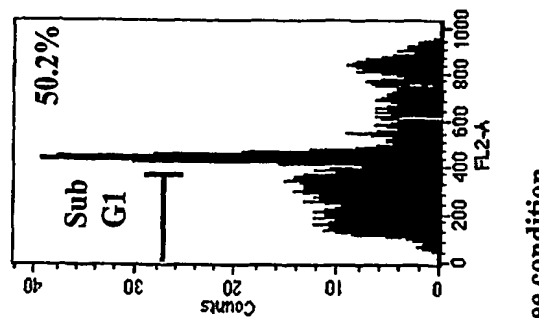
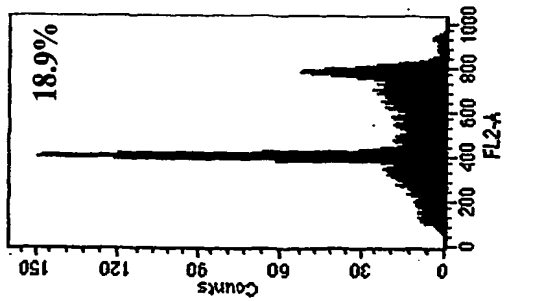
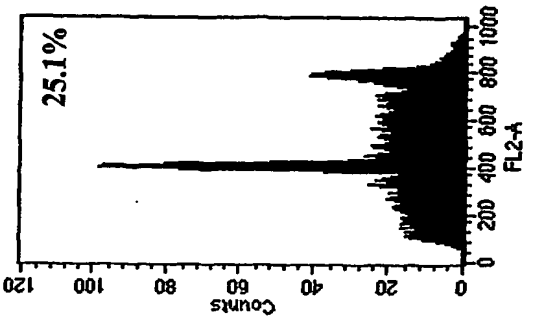
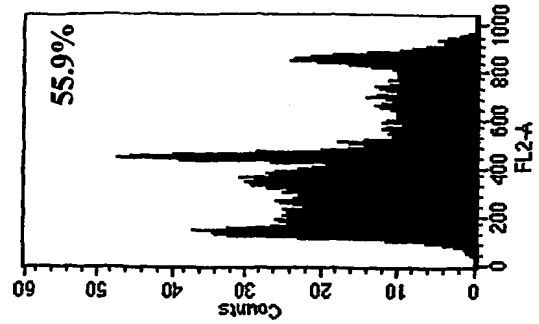


4 / 7
Fig. 4



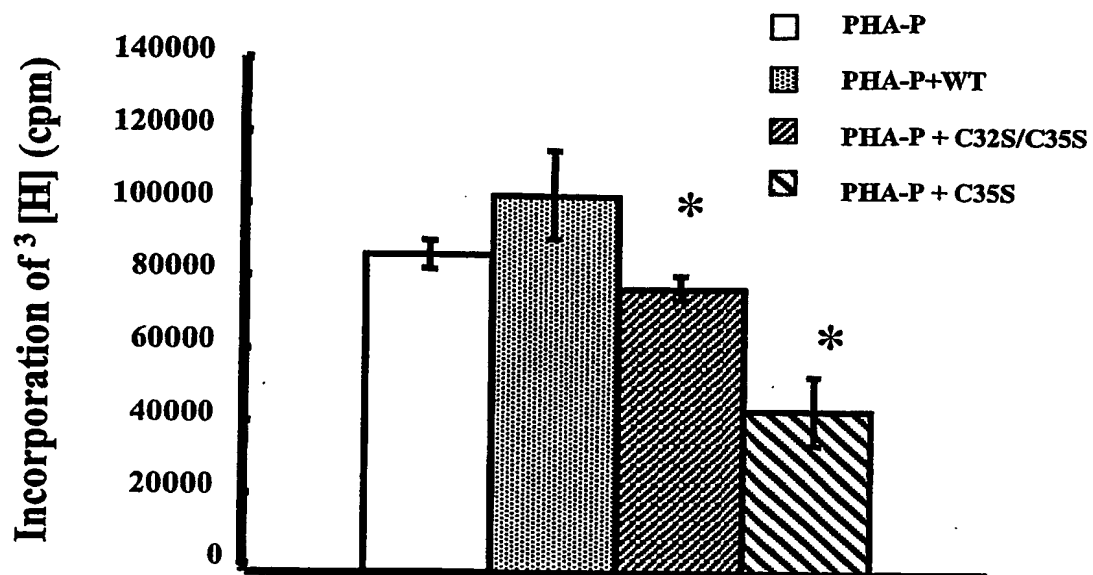
DNA content

normal condition



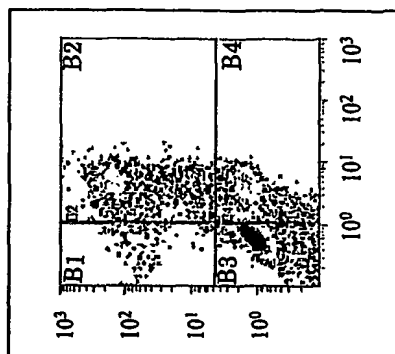
DNA content

serum free condition

5 / 7
Fig. 5

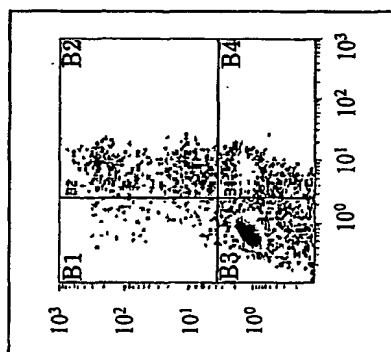
6 / 7
Fig. 6

C35S-TRX



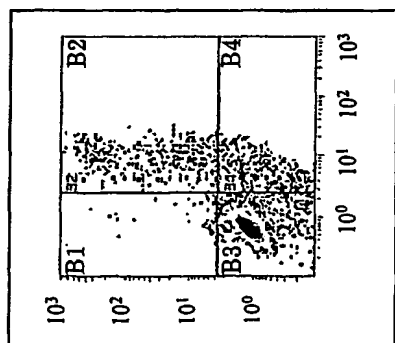
1.2%	19.0%
54%	25.8%

CS-TRX



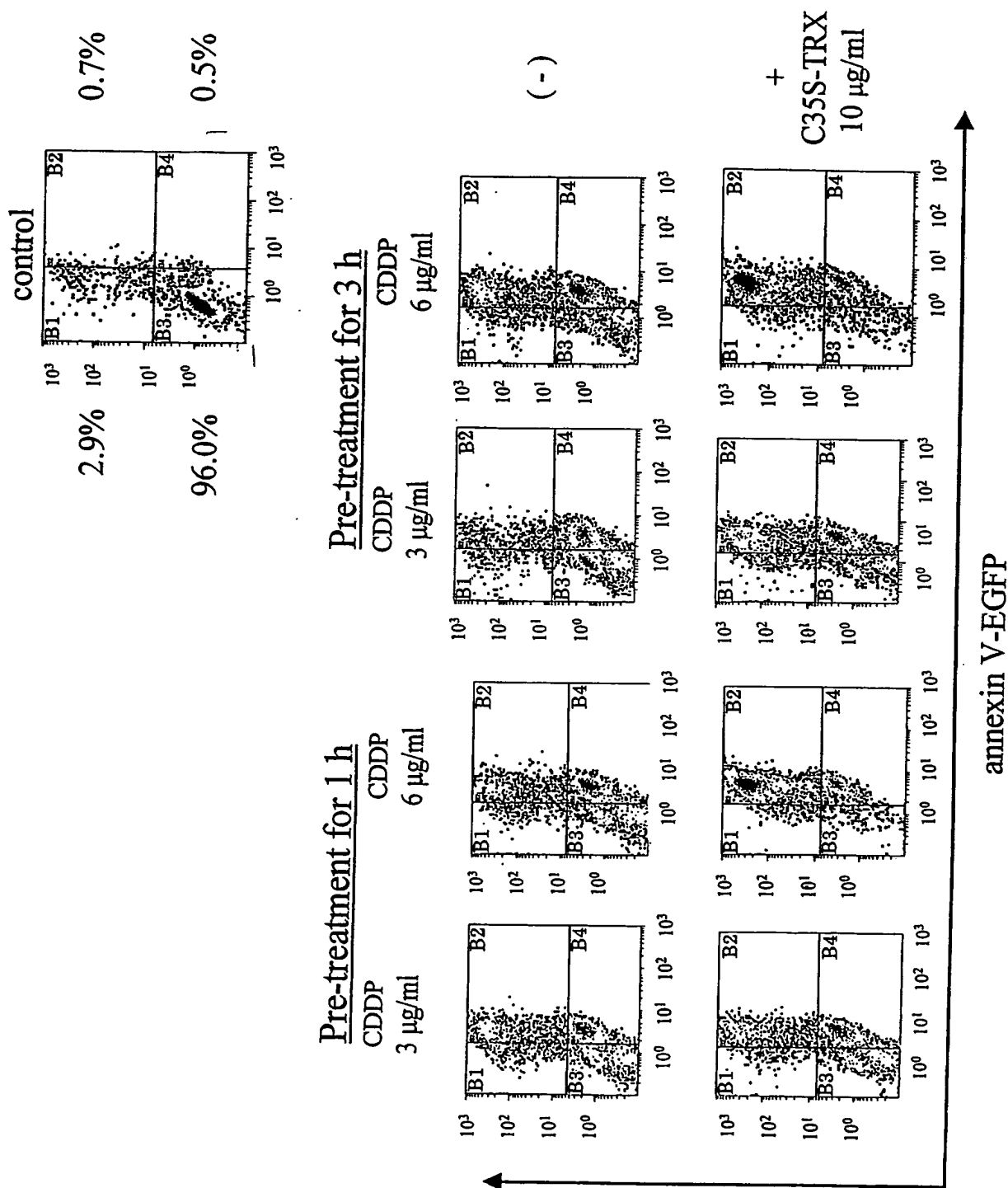
0.8%	5.9%
74.5%	18.7%

WT-TRX



0.5%	5.3%
84.0%	10.2%

7 / 7
Fig. 7



1/7

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Thioredoxin derivatives

<130> P04-01

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (318)

<223>

<400> 1

atg	gtg	aag	cag	atc	gag	agc	aag	act	gct	ttt	cag	gaa	gcc	ttg	gac	48
Met	Val	Lys	Gln	Ile	Glu	Ser	Lys	Thr	Ala	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	
1			5						10					15		

gct	goa	ggt	gat	aaa	ctt	gta	gta	gtt	gac	ttc	tca	gcc	acg	tgg	tgt	96
Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Leu	Val	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Ala	Thr	Trp	Cys	
		20						25						30		

ggg	cct	tgc	aaa	atg	atc	aag	cct	ttc	ttt	cat	tcc	ctc	tct	gaa	aag	144
Gly	Pro	Cys	Lys	Met	Ile	Lys	Pro	Phe	Phe	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	
		35					40							45		

tat	tcc	aac	gtg	ata	ttc	ctt	gaa	gta	gat	gtg	gat	gac	tgt	cag	gat	192
Tyr	Ser	Asn	Val	Ile	Phe	Leu	Glu	Val	Asp	Val	Asp	Asp	Cys	Gln	Asp	
		50				55								60		

gtt	gct	tca	gag	tgt	gaa	gtc	aaa	tgc	atg	cca	aca	ttc	cag	ttt	ttt	240
Val	Ala	Ser	Glu	Cys	Glu	Val	Lys	Cys	Met	Pro	Thr	Phe	Gln	Phe	Phe	
65					70					75				80		

aag	aag	gga	caa	aag	gtg	ggt	gaa	ttt	tct	gga	goc	aat	aag	gaa	aag	288
Lys	Lys	Gly	Gln	Lys	Val	Gly	Glu	Phe	Ser	Gly	Ala	Asn	Lys	Glu	Lys	
			85						90					95		

ctt	gaa	goc	acc	att	aat	gaa	tta	gtc	taa	318
Leu	Glu	Ala	Thr	Ile	Asn	Glu	Leu	Val		

2/7

100

105

<210> 2
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp
 1 5 10 15

Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys
 20 25 30

Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys
 35 40 45

Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp
 50 55 60

Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
 85 90 95

Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
 100 105

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ggatccgtga agcagatcga gagcaag

27

<210> 4
 <211> 30

3/7

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gtcgacttag actaattcat taatggtggc

30

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cttgatcatt ttgcaaggcc cagacca

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tggtctgggc cttgcaaaat gatcaag

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cttgatcatt ttggaaggcc cacacca

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tggtgtgggc cttccaaaat gatcaag

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

tggtotgggc cttccaaaat gatcaag

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

cttgatcatt ttggaaggcc cagacca

27

<210> 11

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (103).. (105)

<223> nnn stands for any base for coding Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or Phe.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (318)

<223> The 'Xaa' at location 35 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or Phe.

<400> 11

atg gtg aag cag atc gag agc aag act gct ttt cag gaa gcc ttg gac 48
Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp
1 5 10 15

gct gca ggt gat aaa ctt gta gta gtt gac ttc tca gcc acg tgg tgt 96
Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys
20 25 30

ggg cct nnn aaa atg atc aag cct ttc ttt cat tcc ctc tct gaa aag 144
Gly Pro Xaa Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys
35 40 45

tat tcc aac gtg ata ttc ctt gaa gta gat gtg gat gac tgt cag gat 192
Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp
50 55 60

5/7

gtt gct tca gag tgt gaa gtc aaa tgc atg cca aca ttc cag ttt ttt 240
 Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe
 65 70 75 80

aag aag gga caa aag gtg ggt gaa ttt tct gga gcc aat aag gaa aag 288
 Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
 85 90 95

ctt gaa gcc acc att aat gaa tta gtc taa 318
 Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
 100 105

<210> 12
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (318)
 <223>

<400> 12
 atg gtg aag cag atc gag agc aag act gct ttt cag gaa gcc ttg gac 48
 Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp
 1 5 10 15

gct gca ggt gat aaa ctt gta gta gtt gac ttc tca gcc acg tgg tgt 96
 Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys
 20 25 30

ggg cct tcc aaa atg atc aag cct ttc ttt cat tcc ctc tct gaa aag 144
 Gly Pro Ser Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys
 35 40 45

tat tcc aac gtg ata ttc ctt gaa gta gat gtg gat gac tgt cag gat 192
 Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp
 50 55 60

gtt gct tca gag tgt gaa gtc aaa tgc atg cca aca ttc cag ttt ttt 240
 Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe
 65 70 75 80

aag aag gga caa aag gtg ggt gaa ttt tct gga gcc aat aag gaa aag 288
 Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
 85 90 95

ctt gaa gcc acc att aat gaa tta gtc taa 318
 Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
 100 105

<210> 13
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (318)
 <223>

<400> 13
 atg gtg aag cag atc gag agc aag act gct ttt cag gaa gcc ttg gac 48
 Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp
 1 5 10 15

gct gca ggt gat aaa ctt gta gta gtt gac ttc tca gcc acg tgg tct 96
 Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Ser
 20 25 30

ggg cct tcc aaa atg atc aag cct ttc ttt cat tcc ctc tct gaa aag 144
 Gly Pro Ser Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys
 35 40 45

tat tcc aac gtg ata ttc ott gaa gta gat gtg gat gac tgt cag gat 192
 Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp
 50 55 60

gtt gct tca gag tgt gaa gtc aaa tgc atg cca aca ttc cag ttt ttt 240
 Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe
 65 70 75 80

aag aag gga caa aag gtg ggt gaa ttt tot gga gcc aat aag gaa aag 288
 Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
 85 90 95

ctt gaa gcc acc att aat gaa tta gtc taa 318
 Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
 100 105

<210> 14
 <211> 318
 <212> DNA

<223>

ctt gaa gcc acc att aat gaa tta gtc taa 318
Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
100 105